



# 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C07K 15/04, 15/14, C12P 21/02 // C07K 3/20 (C12P 21/02 C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 92/18537</p> <p>(43) 国際公開日 1992年10月29日 (29. 10. 1992)</p>					
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00487</p> <p>(22) 国際出願日 1992年4月17日 (17. 04. 92)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平 3/86602</td> <td>1991年4月18日 (18. 04. 91)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平 3/88284</td> <td>1991年4月19日 (19. 04. 91)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p> <p>桜井信豪 (SAKURAI, Shingou) [JP/JP] 〒411 静岡県三島市文教町2-26-46 Shizuoka, (JP)</p> <p>成戸昌信 (NABUTO, Masanobu) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市津西1-20-31 H-2 Kanagawa, (JP)</p> <p>木原 敏 (KIHARA, Makoto) [JP/JP] 〒411 静岡県三島市大場638-8 Shizuoka, (JP)</p> <p>花田敏三 (HANADA, Keizo) [JP/JP] 〒240 神奈川県横浜市保土ヶ谷区鎌谷町48-13 Kanagawa, (JP)</p> <p>佐野恵海子 (SANO, Emiko) [JP/JP] 〒241 神奈川県横浜市旭区中希望ヶ丘212-21 Kanagawa, (JP)</p> <p>市倉 茂 (IOHIKURA, Shigeru) [JP/JP] 〒411 静岡県三島市芙蓉台2-9-16 Shizuoka, (JP)</p> <p>内海 潤 (UTSUMI, Jun) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市津西2-3-6 I-2 Kanagawa, (JP)</p>	特願平 3/86602	1991年4月18日 (18. 04. 91)	JP	特願平 3/88284	1991年4月19日 (19. 04. 91)	JP	<p>細井和男 (HOSOI, Kazuo) [JP/JP] 〒411 静岡県駿東郡長泉町東野119-8 Shizuoka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FI, FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), MO (欧州特許), NL (欧州特許), NO, SE (欧州特許), US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平 3/86602	1991年4月18日 (18. 04. 91)	JP					
特願平 3/88284	1991年4月19日 (19. 04. 91)	JP					
<p>(54) Title : INTERLEUKIN 6 COMPOSITION AND PRODUCTION THEREOF</p> <p>(54) 発明の名称 インターロイキン6組成物およびその製造法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A composition containing human interleukin 6 having a saccharide chain, a process for producing human interleukin 6 by culturing cells in a medium containing ascorbic acid or its derivative, and a process for purifying a crude human interleukin 6 solution by chromatography using heparin carrier. The invention makes it possible to produce a high-quality composition containing human interleukin 6 having a saccharide chain to thereby apply the same in the medicinal use and to establish a process for mass producing human interleukin 6.</p>							

本発明は、糖鎖を有するヒト・インターロイキン6を含む組成物、アスコルビン酸またはその誘導体を含む培地で細胞を培養し、ヒト・インターロイキン6を産生させる方法、および粗ヒト・インターロイキン6原液をヘパリン担体を用いたクロマトグラフィーにより精製する方法である。

本発明により、高品位の糖鎖を有するヒト・インターロイキン6組成物を製造することができ、医薬への応用を可能とした。またヒト・インターロイキン6の大量製造法が確立された。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
AU	オーストラリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
BB	バルバドス	GA	ガボン	MW	マラウイ
BE	ベルギー	GN	ギニア	NL	オランダ
BF	ブルキナファソ	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IE	アイルランド	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU	ソビエト連邦
CI	コートジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トogo
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
ES	スペイン	ML	マリ		

## 明 細 書

## インターロイキン6組成物およびその製造法

## 技 術 分 野

本発明は、インターロイキン6（以下IL-6と略す）  
5 組成物およびその製造法に関する。さらに詳しくは、医薬としての有用な糖鎖を有するヒトIL-6組成物、およびそれを高品位でかつ大量に生産する製造法に関する。

## 背 景 技 術

IL-6は、Bリンパ球分化因子、インターフェロン  
10  $\beta_2$ 、26Kd蛋白、ハイブリドーマ/プラズマサイトーマ増殖因子、あるいは肝細胞刺激因子などとよばれていたサイトカインの統一名である。

IL-6は、活性化されたB細胞に対し、抗体産生細胞への分化を誘導する。T細胞に対しては、マイトジェン刺激を受けたT細胞にIL-2産生を誘導したり、ある種のT細胞株や胸腺細胞にIL-2レセプターを誘導する。造血細胞に対してはIL-3存在下でIL-6が造血幹細胞の増殖を相乗的に誘導する。また、最近、IL-6はトロンボポエチン様の作用を有していることが  
15 報告されている。この様にIL-6は、多くの生理活性を有しており、臨床への応用が期待されている。

IL-6は様々な細胞によって産生される。リンパ球のほかにヒト線維芽細胞をPoly(I)・Poly(C)とシクロヘキシミドを刺激することで産生される(Eur. J. Biochem., 159, 625, (1986))。また、マウスのIL-6はPo  
25

ly (A) ・ Poly (U) で刺激して産生される (Immunopharmacology, 21, p33, (1991) )。誘導物質は多岐にわたり IL-1, TNF, IFN- $\beta$ などのサイトカインや PDGF, TGF- $\beta$ などの増殖因子, LPS, PMA, PHA, コレラ毒素などが知られている (Science, 235, 731 (1987))。また、ヒト血管内皮細胞、マクロファージ、ヒトグリオブラストーマなども IL-6 を産生することが報告されている (Immunol., 142, 144, (1989), J. Immunol., 141, 1529, (1988), 特開昭63-296688) )。また、誘発剤を用いて細胞を刺激した後、ベラパミル、シクロヘキシミド、アクチノマイシンDなどの代謝阻害剤で細胞を処理することにより産生を一層増強せしめる方法 (J. Immunol., 144, 4242-4248 (1990)) も知られる。しかしながら、IL-6 についてその産生細胞の種類や誘導物質などの違いによる活性、構造等の違いは未知である。少なくとも IL-6 を医薬として有効活用していく際には、大量生産系の開発と生産された IL-6 の物質的性状およびその生物活性の解明が必要とされるが、臨床応用に適用できる高品位の糖鎖付き IL-6 を効率的に大量生産する方法は現在のところまだ確立されていない。

また、従来から知られている IL-6 の精製法には、まず初段に CPG (controlled pore glass) にバッチ吸着させ酸で回収した後、ポリクローマル抗体カラム／ゲルろ過クロマトグラフィー／イオン交換クロマトグラ

フィー／C1カラムを利用した逆相高速液体クロマトグラフィーと組み合わせて精製する方法 (Eur. J. Biochem. 168, 543 (1987))、あるいは、膜濃縮／ゲルろ過クロマトグラフィー／透析／イオン交換クロマトグラフィー／FPLC／逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の組み合わせ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 5490 (1985)) による方法がある。大腸菌由来の遺伝子組換え IL-6 は、尿素処理／透析／塩酸グアニジン処理／ゲルろ過クロマトグラフィー／イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせで精製されている (東ソー研究報告 第32巻 第2号 (1988))。また、大腸菌で生産したヒトBCDFは、化学結合型 (C<sub>8</sub>) シリカゲルを充填剤とする2段階逆相HPLCに供し、タンパク純度を99%以上、エンドトキシンを0.6 EU / mg蛋白以下に精製する方法がある (特開平2-186996)。しかし、これら従来の精製法では繁雑で工業的生産時の大量処理には適していないほか、逆相HPLCの条件ではタンパク質に対して温和な条件ではなく、タンパク質の変性や会合体の形成などが起こりやすく、高品位のIL-6標品を得るには必ずしも適当な方法ではない。

以上述べてきたように、医薬としてIL-6を産業上利用するには高品位な大量標品の調製、およびその標品の性状解明が課題として残っている。本発明はこれを解決し、高品位な糖鎖を有するIL-6組成物を工業的に

安定に生産し、提供しようとするものである。

### 発 明 の 開 示

本発明は、糖鎖を有し、一定の規定された性状を有するヒト I L - 6 組成物と、それをより効果的に得るべく、  
5 ヒト I L - 6 の製造法を提供するものであり、具体的には、ヒト I L - 6 産生細胞を培養しヒト I L - 6 を生産させる際に、培地中にアスコルビン酸またはその誘導体を添加することを特徴とするヒト I L - 6 の製造法、および粗 I L - 6 原液をヘパリンを結合させた担体（以後、  
10 ヘパリン担体とよぶ）を用いたクロマトグラフィーにより精製することを特徴とするヒト I L - 6 の製造法を提供する。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明のヒト I L - 6 組成物は、糖鎖を有するいわゆる天然型のヒト I L - 6 を含み、それは (1) S D S - P  
15 A G E で少なくとも分子量が 2 2 0 0 0 ~ 2 5 0 0 0 および 2 6 0 0 0 ~ 3 0 0 0 0 の 2 成分を含み、その含有量がそれぞれ 6 0 ~ 9 0 % および 4 0 ~ 1 0 % であること、(2) 末端アミノ酸配列が少なくとも、P r o - V a  
20 l - P r o - P r o - G l y - 、 V a l - P r o - P r o - G l y - G l u - および A l a - P r o - V a l - P r o - P r o - から成る 3 種類の配列を含み、かつ V a l - P r o - P r o - G l y - G l u - の含有量が 4 0 % 以上（好ましくは 5 0 % 以上）である、(3) 構成糖  
25 として、マンノース、フコース、ガラクトース、N - ア

セチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、およびN-アセチルノイラミン酸を含むこと、で特徴づけられる性状を示す。

これらの性状はIL-6の本来の生理活性を十分に発揮するにふさわしい高品位な特性を示し、生体内で安定性が良くかつ抗原性が非常に低いことが期待される。このようなヒトIL-6組成物は、以下に述べるような大量培養法と大量精製法により、工業的生産が可能である。

IL-6はさまざまな細胞により恒常的に、あるいは種々の刺激により産生される。また、遺伝子組換え細胞によっても産生される。

糖鎖付IL-6は、T細胞、B細胞、単球マクロファージに代表される浮遊細胞と、線維芽細胞、骨肉腫細胞、肺癌細胞、血管内皮細胞に代表される接着依存性細胞株により産生されるが、本発明のIL-6産生細胞としては接着依存性細胞が好ましく用いられる。特に、線維芽細胞が好ましく用いられる。

また、本発明のIL-6産生細胞としては、遺伝子組換えCHO細胞に代表される遺伝子組換え細胞も用いることができる。遺伝子組換え細胞にも、宿主細胞の種類により浮遊細胞と接着依存性細胞があるが、本発明は接着依存性細胞が好ましく用いられる。

本発明によれば、IL-6産生細胞を培養して高品位な糖鎖付IL-6を高収率で生産できる。本発明は、浮遊細胞もしくは接着依存性細胞を培養し、誘発剤を用い

ないで恒常的に I L - 6 を産生させるか、あるいは各種 I L - 6 の誘発剤で産生刺激し I L - 6 を産生する際、もしくは遺伝子組換え細胞により I L - 6 を産生する際、培地中にアスコルビン酸、またはアスコルビン酸誘導体を添加し、その産生を増強することを特徴とする I L - 6 の産生方法である。

接着依存性細胞を培養する方法としては、ルー瓶、ローラー瓶を用いる方法、マイクロキャリアーもしくは中空糸に接着培養する方法、あるいはマイクロカプセルに固定化培養する方法などがあるが、マイクロキャリアー、中空糸またはマイクロカプセルを用いる方法が好ましく用いられる。

マイクロキャリアーとしては、マトリックス素材はコラーゲン、ゼラチン、セルロース、架橋デキストラン、ポリスチレンのような合成樹脂からなり、ジメチルアミノプロピル、ジメチルアミノエチル、トリメチルヒドロキシアミノプロピルなどの荷電基が付加されているものが好ましく用いられる。また、マトリックス素材をコラーゲンやゼラチンでコートしたものも使用される。市販品として、架橋デキストランにジメチルアミノエチルを付加した "C y t o d e x - 1" (ファルマシア製)、架橋デキストランに変性コラーゲンをコートした "C y t o d e x - 3" (ファルマシア製) がある。中空糸としては、修飾セルロースを使用した物がある。市販品は、"V i t a f i b e r" (アミコン製) がある。マイク



ロカプセルは、水透過性のあるゲルを形成するコラーゲンやアルギン酸ソーダを用いて、内部に細胞を包埋して作成する (Bio/technol., 1, 736 (1983))。

5 IL-6 産生細胞を誘発剤で処理し IL-6 を産生させる方法としては、天然型もしくは合成 RNA 等の誘発剤、もしくは IL-1、TNF、IFN- $\beta$  などのサイトカイン、もしくは PDGF、TGF- $\beta$  等の増殖因子、  
10 もしくは PMA、PHA、リポポリサッカライドやコレラ毒素などを用いて誘発させる方法がある (Science, 235, 731 (1987))。これらのうち合成 RNA である Poly(I)・Poly(C) を使用するのが好ましい。また、誘発剤を用いて細胞を刺激した後、ペラパミル、シクロヘキシミド、アクチノマイシン D などの代謝阻害剤で細胞を処理することにより産生を一層増強せ  
15 しめる方法 (J. Immunol., 144, 4242-4248 (1990)) も用いられる。

本発明は IL-6 産生細胞培養中において、培地中にアスコルビン酸もしくはその誘導体を添加することを特徴とする。アスコルビン酸もしくはその誘導体を添加する時期は特に限定されないが、誘発剤を用いて IL-6  
20 を産生させる場合は、IL-6 産生細胞を増殖させた後、誘発剤で刺激して IL-6 を産生させる時、すなわち IL-6 産生培地中に添加することが好ましい。アスコルビン酸もしくはその誘導体は、好ましくは 0.05~1  
25

0 m M、特に好ましくは、0. 5 ~ 3 m M添加する。培養に用いるアスコルビン酸としては、培養条件下で安定かつアスコルビン酸作用をもつ誘導体であることが好ましい。アスコルビン酸誘導体としては、L -アスコルビン酸リン酸エステル（畑ら、1988 第35回コラーゲン研究会抄録 p 85 ~ 89）や、L -アスコルビン酸グルコシドが好ましい。

本発明で用いる培地は通常の市販のものが使用できるが、これら市販培地を修飾した培地も含めて細胞に適した培地を適宜選択することが好ましい。例えば、イーグルMEM、RPMI 1640、 $\alpha$ -MEMやこれらの修飾培地が好ましく用いられる。また、培養液中の溶存酸素濃度及びpHは、細胞に適した範囲内で制御することが好ましく、溶存酸素濃度は通常、空気に対する飽和溶解度の20 ~ 80 %、好ましくは40 ~ 65 %の範囲に保つことが好ましい。同様にpHは7. 0 ~ 8. 0の範囲に制御することが好ましい。

また、糖鎖を有するIL-6を産生させるためには、培地中の糖を欠乏させないように糖を追加して添加することが好ましい。糖としては一般的にはグルコース、麦芽糖などが用いられる。特にIL-6産生培地中の糖が欠乏しないように1日1回 ~ 数回添加するか、もしくは連続添加するなどの操作が好ましい。たとえばグルコースでは、培地中の濃度が0. 1 ~ 2. 5 g / L、好ましくは0. 2 ~ 1. 5 g / Lの濃度に維持することが好ま

しい。

これら産生した原液中のヒト I L - 6 は、後述する酵素免疫測定法 (E L I S A 法) および H P G F (hybridoma/plasmacytome growth factor) 活性測定などで確認することができる。

このようにして得られる I L - 6 原液をヘパリン担体に接触させる場合には、あらかじめ公知の方法 (J. Exp. Med., 165, 914 (1987), The Biology of the interferon System 1988, p. 395 など) にしたがって、粗 I L - 6 をシリカ系吸着剤 (以下シリカ担体と略す) などを用いて前濃縮しておくことが好ましい。シリカ担体としては、好ましくは "C P G" (controlled pore glass) やシリカビーズなどが用いられる。具体的には "C P G" (シグマ製) や "マイクロビーズシリカゲル" (富士デビソン製) などが挙げられる。前濃縮した I L - 6 液は引き続き陽イオン交換体に素通りさせることで夾雑物を吸着除去し、さらに精製純度を上げることもできる。ここでいう陽イオン交換体とは骨格担体としてセルロース、アガロースなどを材料とする多糖類系および合成高分子系などの不溶性担体にカルボキシル基や、スルホン酸基あるいはリン酸基などを結合した担体である。具体的には "S セファロース F F" (ファルマシア製) や "C M セファロース C L - 6 B" (ファルマシア製) などが挙げられる。

本発明で用いるヘパリン担体とは、骨格担体としてセ

ルコース、アガロースなどを材料とする多糖類系および合成高分子系などの不溶性担体にヘパリンを結合させたものならばいずれでもよい。具体的には“ヘパリントヨパール”（東ソー製）や“ヘパリンセルロファイン”

（チッソ製）が挙げられる。

粗 I L - 6 液をヘパリン担体に接触させる場合、p H を 5 ~ 1 0 に調節することが望ましい。特に好ましくは、ヘパリンに対する親和性を十分に確保できる p H 5 . 5 ~ 8 . 0 の範囲でイオン強度 0 . 3 以下がよい。このようにヘパリン担体に吸着させた I L - 6 は、イオン強度を高くすることで回収することができる。例えば、リン酸ナトリウム緩衝液などの緩衝液に塩化ナトリウム、硫酸アンモニウムなどの無機塩を添加した液により回収することができる。回収方法は、塩濃度をグラジエント式に増加させる方法でも段階的に増加させるステップワイズ式でもよい。具体的に用いられるイオン強度は 0 . 3 ~ 2 で好ましくは 0 . 3 ~ 1 である。

さらに、純度を向上させるには疎水性基を結合した担体（以下、疎水性担体と略す）を用いることが有用である。上記ヘパリン担体で処理した I L - 6 液に塩を添加したり、あるいは酸性条件にすることで疎水性担体に効率よく I L - 6 を吸着させることができる。吸着方法はカラム法でもバッチ法でもよい。

ここに用いる疎水性担体は、アルキル基（ $C_1 \sim C_{18}$ ）、フェニル基、オクチル基などが担体骨格に化学的に結

合されたものならばいずれでもよいが、フェニル基やブチル基を有するものが特に望ましい。骨格担体としては、セルロース、アガロースなどを材料とする多糖類系および合成高分子系などの不溶性担体を用いることができる。

5 具体的に使用可能な疎水性担体としては“ブチルトヨパール”（東ソー製）や“フェニルセルロファイン”（チッソ製）などが挙げられる。吸着は $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{NaCl}$ などの塩を高濃度

10 に添加して行うが、好ましい吸着条件は、 $\text{NaCl}$ でいうならば0.2M～5M、またはpHが2～7.5であり、その両方を組み合わせた条件とするのも可能である。吸着させた疎水性担体は、常法にしたがってグラジエント方式またはステップ的に塩濃度を下げて目的タンパク質を溶出させることができる。また、塩濃度をさげ

15 るほかにpHや温度を適宜変えても有効な場合がある。本疎水性クロマトグラフィーによれば、例えばpH5～9で塩濃度を下げるによりIL-6は効率よく溶出され、他の夾雑タンパク質と分離することができる。また、夾雑タンパク質の除去のためにIL-6の溶出を伴

20 なわない各種溶液を用いてあらかじめ洗浄することも可能である。例えば、吸着イオン強度をやや下げた中性緩衝液やpH2付近の塩濃度の著しく低い酸性溶液は効率よく夾雑タンパク質を除去することができる。

疎水性担体を用いる場合は、ヘパリン担体と疎水性担

25 体の使用する順序はどちらでも構わないが、溶液の組成

上へパリン担体を使用した後に、疎水性担体を使用するのが好ましい。

以上のようにヘパリン担体を用いる精製法で得られた I L - 6 標品は、逆相高速液体クロマトグラフィーを用いた分析では純度 9 5 % 以上であった。

また、本発明に記載した精製法は動物細胞によって産生される I L - 6 のみならず大腸菌、酵母あるいは昆虫細胞等を宿主として組換えられた細胞により得られるヒト I L - 6 の精製にも適用されるものである。

また、本発明で得られたヒト I L - 6 組成物を製剤化するにあたっては、ヒト血清アルブミンや適当な界面活性剤や糖などを安定化剤として用いることが好ましい。また、適当な糖やアミノ酸などを賦形剤として添加して凍結乾燥製剤とすることができる。あるいは、溶液を無菌濾過後、注射剤とすることができる。さらに医薬用途の基剤と共に、軟膏、嚢剤、錠剤等への処方も可能である。

本発明にかかるヒト I L - 6 の定量は、中和活性を有するモノクローナル抗体 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 165, 728-734 (1989)) を使った E L I S A や、ヒト B C D F に反応して I g M を産生するヒト B 細胞株 C L 4 (Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 5490 (1985))、あるいは I L - 6 依存性に増殖するマウスハイブリドーマ株細胞 7 T D 1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 9678-9683 (1986)) などを用いることで達成される。

## 実 施 例

以下に、実施例にしたがって本発明を具体的に説明するが、これらにより本発明が限定されるものではない。

## 実施例 1

5        2 リットルのガラス製培養槽に 1 リットルの 5 % の新生子牛血清を含むイーグル MEM 培地中で、細胞数が  $10^6$  個/ml になるようにヒト線維芽細胞をマイクロキャリア上で培養した〔マイクロキャリア：“サイトデックス 1”（ファルマシア製）、37℃〕。その後、培地を  
10        少量のカルボキシメチルセルロースを含む無血清イーグル MEM 培地 1 リットルに交換し、プライミングとして 10 万単位/リットルのヒト天然型インターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) を添加した。翌日、さらに Poly(I)・Poly(C) 10 mg/リットルを添加して誘発処理を行なった。  
15        その 2 時間後、産生培地として少量のメチルセルロースを含むイーグル MEM 培地に置換した。その後 6 日間そのまま 37℃ で培養を続けた。

      攪拌を停止し、マイクロキャリアを沈降させた後、上清および産生培地での洗液ろ過し、1 リットルを別の容  
20        器に移した。シリカ担体〔“マイクロビーズシリカゲル”（富士デビソン製）〕は、リン酸ナトリウム緩衝液中で高圧蒸気滅菌（121℃、30 分）した後、4 ml ずつ 2 本のカラムに充填して直列に接続させた。これにフィルターでろ過した後の産生液を流速 20 ml/hr で流した。  
25        全量流した後、2 本のカラムを別々にクロマトグラフィ

—した。それぞれリン酸ナトリウム緩衝液 25 ml を流した後、20 mM 塩酸を流してヒト IL-6 含有画分 10 ml を回収した。この塩酸回収液に、さらに 0.3 M リン酸水素 2 ナトリウム水溶液を添加して pH を 6.4 に調節した。このとき生成する沈殿物を 3000 rpm、4℃、30 分遠心分離し、除去した。

分離した上清をそれぞれそのままヘパリンクロマトグラフィー担体である“AF-ヘパリントヨパール 650 M” 1 ml (東ソー製) を充填したカラムに流し、吸着させた。このカラムを 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.4 で洗浄した後、0.3 M NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で回収し、2 ml のヒト IL-6 を含む画分を得た。この時点でそれぞれをプールした。さらに、この画分に 4 M 塩化ナトリウムを添加し、全体の塩濃度が 2.15 M になるように調整した。つづいて、この画分を 1 ml の“ブチルトヨパール 650 M” (東ソー製) を充填したカラムに流し、吸着させた。吸着時の温度は 23℃であった。この後、2 M NaCl を含む緩衝液 (pH 7.2)、2 M NaCl を含む 20 mM HCl (pH 1.8)、20 mM HCl (pH 1.8)、0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8)、0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で順次洗浄し、最後に 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で回収した。このようにして得られた精製ヒト IL-6 の蛋白質純度は 95% 以上 ( $C_{18}$  逆相高



速液体クロマトグラフィーによる評価)で、産生原液に対する収率は30%であった。

なお、ヒトIL-6の濃度の定量は、96穴プレートを用いたELISA法を使った。すなわち、抗IL-6  
5 モノクローナル抗体を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でプレートにコートした。ウシ血清アルブミン(BSA)を含むリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、洗浄バッファー)でブロッキングした後、二次抗体としてヤギの抗IL-6抗体をビオチン標識したものを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50\mu\text{l}$ を  
10 まずプレートにのせ、さらに濃度既知のIL-6標準品と未知濃度のIL-6液を、それぞれ $100\mu\text{l}$ 加え、1時間振盪しながら反応させた。洗浄バッファーで3回洗浄した後、洗浄バッファーで2000倍希釈した“ストレプトアピジン-HRPコンジュゲート”(BRL製)  
15 を $100\mu\text{l}$ 添加し、30分反応させた。洗浄バッファーで3回洗浄した後、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素を含むクエン酸緩衝液(pH5.0)を $100\mu\text{l}$ 添加し発色反応させた。30分後、4.5N硫酸で反応停止し、各ウェルの発色量をマイクロプレート用光度計  
20 (“マルチスキャンCM”：フローラボラトリー製)を用い、492~690nmで測定した。

## 実施例2

実施例1に述べた条件で3ロットのヒトIL-6精製標品を調製した。この精製標品(約 $5\mu\text{g}$ )について還  
25 元条件下のSDS-PAGE(5-20%グラジエント

ゲル)を行った。泳動後のゲルをクーマシーブリリアント・ブルーで染色したところ、分子量22000~25000および26000~30000の2つのバンドが主成分として検出された。それぞれのバンドの存在比は  
5 クロマト・スキャナーで定量したところ、それぞれ75±15%および25±15%であった。

また、各精製標品約10μgをもちいてN末端アミノ酸配列分析を行ったところ、いずれのロットからもVal-Pro-Pro-Gly-Gluが主成分として  
10 検出された。さらに少なくともPro-Val-Pro-Pro-GlyとAla-Pro-Val-Pro-Proの2成分が副成分として含まれていた。

さらに各精製標品約30μgを用いて糖組成分析を行ったところ、いずれのロットからも、構成単糖としてマンノース、フコース、ガラクトース、グルコサミン、ガラクトサミン、およびN-アセチルノイラミン酸が検出  
15 された。存在量はタンパク質1モルあたり、フコースで0.2モル以上、その他の単糖で0.5モル以上が含まれていた。

### 20 実施例3

胎児牛血清5%およびジエチルアミノエチル基を有する架橋デキストランマイクロキャリア3g/Lを含むイーグルMEM系培地 2Lにヒト線維芽細胞を約 $2 \times 10^5$ 個/mlの割合で接種したスピナーフラスコでゆるく攪拌しながら37℃、pH7.2、20%飽和酸素濃  
25

度で6日間培養した。途中、1日目、3日目、5日目に  
培地交換を行った。到達細胞数は、 $3.2 \times 10^6$  個/  
mlであった。次に、IFN- $\beta$  100 国際単位/ml、  
カルボキシメチルセルロースを含む、イーグルMEM  
培地と交換し、37℃、pH 7.2、20%飽和酸素濃  
度で24時間インキュベートした。次に、Poly(I)・Po  
ly(C) を  $10 \mu\text{g/ml}$  加え 37℃で2時間インキュベ  
ートした後、イーグルMEM系培地で培地交換し、L-  
アスコルビン酸リン酸エステルを 1.0 mM 添加し、さ  
らに 37℃、pH 7.2、20%飽和酸素濃度で6日間  
培養した。最終的に産生されたインターロイキン6の量  
は酵素免疫測定法で測定した。結果は、L-アスコルビ  
ン酸リン酸エステル無添加としたものの相対力価を 10  
0 とすると、1.0 mM 添加した場合の相対力価は、1  
20 であった。

#### 実施例 4

実施例 3 と同様にヒト線維芽細胞を培養し、16リッ  
トルタンク中で  $1.7 \times 10^6$  個/mlの細胞を得た。次  
に培地を IFN- $\beta$  100 IU/ml とカルボキシメチ  
ルセルロース 0.2% を含むイーグルMEM培地に交換  
し、37℃、pH 7.2、20%飽和酸素濃度で24時  
間インキュベートした。次に、Poly(I)・Poly(C) を  
 $10 \mu\text{g/ml}$  加え 37℃で2時間インキュベートした後、  
イーグルMEM系培地で培地交換した。その後、グルコ  
ース 1 g/L とアスコルビン酸リン酸エステルMg塩 0.

4 m Mを含む培地に置換し、6日間通気培養した。この  
間1、2日目に1 g / L, 3、4日目に0. 5 g / Lの  
グルコースを追加添加した。上記培養タンク2基分の産  
5 生液を実施例1と同様にシリカ担体240 m lにカラム  
吸着させた。吸着済み担体を1 M N a C l 液、リン酸  
ナトリウム緩衝液でそれぞれ約1 L 洗浄後、20 m M塩  
酸水溶液700 m lでI L-6を回収した。回収後直ち  
に、0. 1 Mリン酸3ナトリウムでp H 7. 0に中和し  
た。この液を“S PセファロースF F”（ファルマシア  
10 製）6 m lに素通りさせた。この後、実施例1と同様に  
“ヘパリントヨパール650 M”50 m lに吸着させ、  
10 m Mリン酸ナトリウム緩衝液（p H 6. 4）で洗浄  
し、0. 3 M N a C lを含む20 m Mリン酸ナトリウム  
緩衝液でI L-6を含む画分100 m lを得た。これに  
15 最終濃度が3 MになるようにN a C lを添加し、“フェ  
ニルセルロファインS”（チッソ製）70 m lにカラム  
吸着させた。吸着時の温度は30℃であった。このカラ  
ムは順次、3 M N a C l 液、20 m M塩酸溶液、リン酸  
ナトリウム緩衝液（p H 5. 8）で洗浄し、最後に10  
20 m Mリン酸ナトリウム緩衝液（p H 7. 2）でI L-6  
液121 m lを回収した。この液のI L-6の純度は9  
8%（逆相高速液体クロマトグラフィー）で産生原液に  
対する収率は57%であった。

#### 実施例5

25

実施例4に述べた条件で4ロットのヒトI L-6精製

標品を調製した。これらの精製標品について SDS-PAGE による分子量分布測定、N末端アミノ酸配列分析および糖組成分析を実施例 2 に準じて行ったところ、いずれの分析でも実施例 2 に示した結果と同じ結果が得られた。また、各ロットの Val-Pro-Pro-Gly-Glu の含有量はそれぞれ 58%、79%、78% および 70% であった。

#### 実施例 6

胎児牛血清 5% およびジエチルアミノエチル基を有する架橋デキストランマイクロキャリア 3 g/L を含むイーグル MEM 系培地 2 L にヒト線維芽細胞を約  $2 \times 10^5$  個/mL の割合で接種したスピナーフラスコでよく攪拌しながら 37°C、pH 7.2、20% 飽和酸素濃度で 6 日間培養した。途中、1 日目、3 日目、5 日目に培地交換を行った。到達細胞数は、 $3.2 \times 10^6$  個/mL であった。次に、IFN- $\beta$  100 国際単位/mL、カルボキシルメチルセルロースを含む、イーグル MEM 培地と交換し、37°C、pH 7.2、20% 飽和酸素濃度で 24 時間インキュベートした。次に、Poly(I)・Poly(C) を  $10 \mu\text{g/mL}$  加え 37°C で 2 時間インキュベートした後、イーグル MEM 系培地で培地交換し、L-アスコルビン酸リン酸エステルを 1.0 mM 添加し、さらに 37°C、pH 7.2、20% 飽和酸素濃度で 6 日間培養した。この間、1 日後、2 日後にそれぞれ 2 g、3 日後、4 日後にそれぞれ 1 g のグルコースを添加した。

6日後に、最終的に産生されたIL-6の量を酵素免疫測定法で測定した。結果は、L-アスコルビン酸リン酸エステルのみを添加としたものの相対力価を100とすると、125であった。

## 5 実施例7

既知文献〔Nature, 324, 73 (1986)〕と同じ遺伝子配列を持つヒトIL-6 cDNAを骨格とするIL-6発現ベクターを、下記の方法で合成したcDNA混合物から下記2本のDNAオリゴマー

10 CCGATCGATGCCAGTACCCCCAGGA  
および

GCCACGGATCCTACATTTGCCGAAG  
をプライマーとしてPCR反応を行なった。得られた増幅DNAを制限酵素ClaIとBamHIで消化した後、  
15 得られたDNA断片を大腸菌発現ベクターpKM6IL-6を得た。このpKMIL-6を大腸菌HB101に導入し、組換え体を得た。この組換え体を下記のように培養して大腸菌組換え型ヒトIL-6を調製した。

20 ヒトIL-6発現プラスミドを保持する大腸菌HB101/pKMIL-6を、30Lの増殖用培地（リン酸1カリウム0.3%、リン酸2ナトリウム0.6%、塩化ナトリウム0.5%、塩化アンモニウム0.1%、グルコース0.5%、カザミノ酸0.5%、硫酸マグネシウム1mM、硫酸第1鉄3μM、ビタミンB<sub>1</sub>6μg/ml、  
25 アンピシリン50μg/ml）30リットル容ジャーに仕

込み、上記組換え体を植菌した。ジャーは攪拌数 300 rpm、通気量 1 VVM、25℃の条件で運転した。トリプトファンオペロンの誘導物質であるインドールアクリル酸を加え、グルコースとカザミノ酸を添加しながら60時間培養した。培養菌体を10,000×g 20分間の遠心分離操作により集めた。菌体は約895g得られた。集められた菌体を1mM EDTA、100mM NaClを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)にOD 550nmが2.0となるように懸濁した。菌体をマントンゴーリンにより破碎し、遠心分離を行ない、破碎抽出物を回収した。抽出液の蛋白質235g、IL-6は495mgであった。ここでIL-6の量は実施例1に示したELISA法で測定した。

抽出液を実施例1で使用したシリカ担体5.5リットルに吸着させ、リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)で洗浄した後、20mM塩酸水溶液で回収した。IL-6は462mg回収した。溶出液に硫酸アンモニウムを終濃度1.33Mになるように添加してから遠心により不溶性不純物を除去した。次に、ブチル担体(“ブチルトヨパール650M”、東ソー製)200mlに吸着させ、20mM塩酸洗いをした後、10mMリン酸ナトリウム緩衝液で回収した。ここで、SDS-PAGE純度検定法により純度84%のIL-6を237mg得た。溶出したIL-6をそのままヘパリン担体(“AF-ヘパリントヨパール650M”、東ソー製)80mlに吸着させ、20mM

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に 0.3 M NaCl を含む液で回収し、純度 91% の IL-6 を 114 mg 得た。溶出液をさらにブチル担体 (前述と同じ) 200 ml で再度精製し、ヒト IL-6 を 66 mg 得た。得られた IL-6 の精製純度は 95% 以上であった (C<sub>18</sub> 逆相高速液体クロマトグラフィーによる分析)。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、医薬としての有用な糖鎖を有するヒト IL-6 を含む組成物の利用が可能となった。本発明に係る IL-6 組成物は、免疫不全症、骨髄移植後あるいは化学療法剤投与後の骨髄抑制、血小板減少症などに汎く治療薬として有用である。また、血中などの IL-6 濃度を測定するための標準品としても利用しうる。

また、本発明に記載した方法により、高品位な IL-6 を大量に製造することができ、また高純度に IL-6 を精製することができる。さらに、スケールアップが容易であり、工業的にも用いることができる。



## 請 求 の 範 囲

1. 糖鎖を有し、次の特性を有するヒト・インターロイキン6を含む組成物。

5 (1) ドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で少なくとも分子量が22000~25000および26000~30000の2成分を含み、その含有量がそれぞれ60%~90%および40~10%である、

10 (2) N末端アミノ酸配列が、少なくともPro-Val-Pro-Pro-Gly、Val-Pro-Pro-Gly-GluおよびAla-Pro-Val-Pro-Proから成る3種類の配列を含み、かつVal-Pro-Pro-Gly-Gluの含有量が40%以上である、

15 (3) 構成糖としてマンノース、フコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンおよびN-アセチルノイラミン酸を含む。

2. ヒト・インターロイキン6産生細胞を培養しヒト・インターロイキン6を産生させる際に、培地中にアスコルビン酸またはその誘導体を添加することを特徴とするヒト・インターロイキン6の製造法。

20 3. ヒト・インターロイキン6産生細胞がヒト線維芽細胞である請求の範囲第2項記載のヒト・インターロイキン6の製造法。

25 4. 培地にさらに糖を添加することを特徴とする請求の

範囲第2項または第3項記載のヒト・インターロイキン6の製造法。

5. ヘパリンを結合した担体を用いたクロマトグラフィーにより精製することを特徴とするヒト・インターロイキン6の製造法。

6. 担体としてさらに疎水性基を結合した担体および／またはシリカ系吸着剤を用いることを特徴とする請求の範囲第5項記載のヒト・インターロイキン6の製造法。

7. シリカ系吸着剤を用いたクロマトグラフィー、ヘパリンを結合した担体を用いたクロマトグラフィー、および疎水性基を結合した担体を用いたクロマトグラフィーをこの順に行なうことを特徴とする請求の範囲第5項または第6項記載のヒト・インターロイキン6の製造法。

8. ヒト・インターロイキン6が、ヒト線維芽細胞を培養して得られるものである請求の範囲第5項～第7項記載のヒト・インターロイキン6の製造法。

9. ヘパリンを結合した担体を用いたクロマトグラフィーにより精製して得られうるヒト・インターロイキン6組成物。

10. 担体としてさらに疎水性基を結合した担体および／またはシリカ系吸着剤を用いることを特徴とする請求の範囲第9項記載のヒト・インターロイキン6組成物。

- 1 1. シリカ系吸着剤を用いたクロマトグラフィー、ヘ  
パリンを結合した担体を用いたクロマトグラフィー、  
および疎水性基を結合した担体を用いたクロマトグラ  
フィーをこの順に行なって得られうる請求の範囲第9  
5 項または第10項記載のヒト・インターロイキン6組  
成物。
- 1 2. ヒト線維芽細胞を培養して得られるヒト・インタ  
ーロイキン6を、ヘパリンを結合した担体を用いたク  
ロマトグラフィーにより精製して得られうる請求の範  
10 囲第9項～第11項記載のヒト・インターロイキン6  
組成物。
- 1 3. ヒト・インターロイキン6組成物が、糖鎖を有し、  
次の特性を有するものである請求の範囲第9項～第1  
2項記載のヒト・インターロイキン6組成物。
- 15 (1) ドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミ  
ドゲル電気泳動で少なくとも分子量が22000～2  
5000および26000～30000の2成分を含  
み、その含有量がそれぞれ60%～90%および40  
～10%である、
- 20 (2) N末端アミノ酸配列が、少なくともPro-Val  
-Pro-Pro-Gly-、Val-Pro-Pro-  
Gly-Glu-およびAla-Pro-Val  
-Pro-Pro-から成る3種類の配列を含み、  
かつVal-Pro-Pro-Gly-Glu-の含  
25 有量が40%以上である、

(3) 構成糖としてマンノース、フコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンおよびN-アセチルノイラミン酸を含む。

5

10

15

20

25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00487

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl <sup>5</sup> C07K15/04, 15/14, C12P21/02//C07K3/20 (C12P21/02, C12R1:91)		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K3/18, 3/20, 15/04, 15/14, C12P21/00, 21/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X/Y	JP, A, 62-263200 (Yeda Research and Development Co., Ltd.), November 16, 1987 (16. 11. 87), & EP, A1, 220574 & AU, A, 8663867	1, 9-13/2-8
X/Y	JP, A, 63-42688 (Tadami Kishimoto and another), February 23, 1988 (23. 02. 88), & EP, A2, 257406	1, 9-13/2-8
X/Y	JP, A, 63-150297 (Ajinomoto Co., Inc. and another), June 22, 1988 (22. 06. 88), (Family: none)	1, 9-13/2-8
X/Y	JP, A, 1-503354 (Genetics Institute, Inc.), November 16, 1989 (16. 11. 89), & WO, A1, 88/206 & EP, A1, 316319	1, 9-13/2-8
Y	JP, A, 60-62997 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), April 11, 1985 (11. 04. 85), & GB, A, 2146645 & DE, A1, 3434122	2-4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"G" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
June 19, 1992 (19. 06. 92)		July 14, 1992 (14. 07. 92)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

- & US, A, 4680261
- Y JP, A, 1-231887 (Dr. Karl Thomae GmbH.), 2-4  
September 18, 1989 (18. 09. 89),  
& DE, A1, 3734632
- Y : JP, A, 61-272202 (Behringwerke AG.), 5-8  
December 2, 1986 (02. 12. 86),  
& DE, A1, 3519011 & EP, A2, 203463  
& AU, A, 8657851
- Y : JP, A, 62-153755 (Showa Denko K.K.), 5-8  
July 8, 1987 (08. 07. 87),  
& GB, A, 2184732 & DE, A1, 3644651  
& US, A, 4913812

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers . . . because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim numbers . . . because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim numbers . . . because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl.<sup>8</sup> C07K15/04, 15/14, 012P21/02  
/C07K3/20 (012P21/02, 012R1:91)

## II. 国際調査を行った分野

調査を行った最小限資料

分類体系

分類記号

IPO

C07K3/18, 3/20, 15/04, 15/14,  
012P21/00, 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)

## III. 関連する技術に関する文献

引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X/Y	JP, A, 62-263200 (イエダ リサーチ アンド デベロップメント コンパニー リミテッド), 16. 11月. 1987 (16. 11. 87), &EP, A1, 220574 &AU, A, 8663867	1,9-13/2-8
X/Y	JP, A, 63-42688 (岸本忠三 外1名), 23. 2月. 1988 (23. 02. 88), &EP, A2, 257406	1,9-13/2-8
X/Y	JP, A, 63-150297 (味の素株式会社 外1名), 22. 6月. 1988 (22. 06. 88), (ファミリーなし)	1,9-13/2-8
X/Y	JP, A, 1-503354 (ジエネティックス・インステイ テコート・インコーポレイテッド), 16. 11月. 1989 (16. 11. 89), &WO, A1, 88/206 &EP, A1, 316319	1,9-13/2-8

## ※引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
(理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の  
日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出  
願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解  
のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新  
規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の  
文献との、当業者にとって自明である組合せによって進  
歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリーの文献

## IV. 証 証

国際調査を完了した日

19. 06. 92

国際調査報告の発送日

14.07.92

国際調査機関

日本国特許庁 (ISA/JP)

権限のある職員

特許庁審査官

内 田 俊 生

4 B 8 2 1 4

## 第2ページから続く情報

## (Ⅱ欄の続き)

Y JP, A, 60-62997 (持田製薬株式会社),  
11. 4月. 1985 (11. 04. 85),  
&GB, A, 2146645 &DE, A1, 3434122  
&US, A, 4680261

2-4

Y JP, A, 1-231887 (ドクトル カルル トーマエ  
ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング),  
18. 9月. 1989 (18. 09. 89),  
&DE, A1, 3734632

2-4

## V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

## VI. 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。



Ⅲ. 関連する技術に関する文献 (第2ページからの続き)		
引用文献の 番号	引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	JP, A, 61-272202 (ペーリングヴェルケ・アク チエンゲゼルシャフト), 2. 12月. 1986 (02. 12. 86), &DE, A1, 3519011 & EP, A2, 203463 & AU, A, 8657851	5-8
Y	JP, A, 62-153755 (昭和電工株式会社), 8. 7月. 1987 (08. 07. 87), &GB, A, 2184732 & DE, A1, 3644651 & US, A, 4913812	5-8